

Paula dos Santos Barcelos

**DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO DE
CHRYSOMYA MEGACEPHALA (FABRICIUS, 1794) (DIPTERA:
CALLIPHORIDAE) EM TEMPERATURA AMBIENTE E O EFEITO
DE BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE A ECLOSÃO DOS OVOS**

Monografia submetida ao Curso de
Graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Carlos J. C.
Pinto.

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da
UFSC.

Barcelos, Paula dos Santos

Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) em temperatura ambiente e o efeito de baixas temperaturas sobre a eclosão dos ovos / Paula dos Santos Barcelos ; orientador, Carlos José de Carvalho-Pinto - Florianópolis, SC, 2014.

54 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Entomologia forense. 3. Intervalo pós-morte. 4. Desenvolvimento pós-embrionário. I. Carvalho-Pinto, Carlos José de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, por despertar o interesse dos filhos para atividades criativas e instrutivas desde cedo.

Ao meu pai, por nunca ter deixado faltar amor na minha vida, por ligar só para dizer que me ama, por ter trago eu e meu irmão para morar com ele, mesmo contra tudo e todos, por priorizar o estudo dos filhos, mesmo possuindo baixa escolaridade e renda, e sempre dizer *"se a vida é difícil com estudo, imagina sem"*.

Ao meu irmão, por desde seu nascimento estar presente de corpo e alma na minha vida, por vivenciar intensamente comigo o real significado da palavra "irmão", por todo o seu companheirismo, carinho e amizade.

Ao meu companheiro, ao qual devo muito o que sou e quero ser, o que conquistei e conquistarei, o que vivi e viverei. Pessoa que me apresentou um mundo de possibilidades, que me instiga, com toda a sua humildade e generosidade, a ser uma pessoa melhor a cada dia.

A tia Janete, por ter acolhido e orientado meu pai, ajudando a concretizar o nosso desejo de morarmos juntos.

Aos meus sogros, minha eterna gratidão, por terem acreditado em mim quando a gente ainda nem se conhecia tão bem.

Aos meus cunhados, ao Leo por toda a ajuda em matemática, a Gi por permitir que o Leo me ajudasse nos dias de descanso, a Lu e ao Di por me incentivarem a entrar na Polícia Civil.

Aos meus sobrinhos, por agregarem a minha vida alegria, carinho, inocência e uma sabedoria que só criança tem.

A Dona Lourdes, pelos conselhos, ajudas e, principalmente, pela inscrição premiada do concurso da Polícia.

Aos professores e amigos do PALAP, por tudo que vivemos juntos, por terem sido fundamentais na formação do meu caráter, por terem me apresentado a Universidade e me feito acreditar que ela poderia fazer parte da minha realidade.

Ao Prof. Nilo, diretor do Curso e Colégio Solução, pelos dois anos de bolsa de estudo, reconhecendo meu esforço e minha dedicação.

Ao tio César, que custeou meus livros, possibilitando minha matrícula na escola particular.

Aos professores do Solução, em especial, ao Chang, a Karine, ao Manuel e ao Japa, por todos os ensinamento e incentivo.

Aos amigos Alberto e Larissa, uma sentimento à flor da pele e outro com os sentimentos escondidos sobre muitas camadas de pele, por todas as conversas durante as crises existenciais, pela amizade e carinho que resistem há todos esses anos.

Ao Rafael Rotta e sua mãe, que em um gesto de compaixão, me oportunizaram uma vaga de estágio.

Ao Helton, pelos almoços, de grande ajuda, e momentos de estudo.

Ao Alex, por estar sempre disposto a colaborar com os meus trabalhos.

A todas as pessoas, colegas, professores e funcionários, que conheci durante a faculdade e perturbaram a minha forma de ver o mundo. Em especial, às grandes parceiras, Aninha, Manu e Tamila, pelas conversas repletas de alegria e palavras sábias, e a Chirle, pelo exemplo de dedicação e determinação.

A Joice, minha amiga de infância que conheci aos 19 anos, na Acadepol, que me ensinou a ser sensível em meio a uma profissão tão insensível.

A todos os colegas da 6ª Deprê, com quem vivi momentos surreais e ao mesmo tempo tão comuns, em especial, ao Emerim, Jorginho, Artur, Flávio, Hugo, Anselmo, Ângela, Raquel, Luiz Fernando, Dela, a Pri, Dona Jô, a Ju e ao Hécio, por todos os conselhos, ajudas, incentivo, e demonstração de afeto.

A todos os delegados e delegadas com que trabalhei durante esse período de estudo, os quais nunca dificultaram meus estudos, em especial, à Del. Sandra Mara e à Del. Ana Silvia, profissionais admiráveis, com quem aprendi e aprendo muito.

Às novas colegas de trabalho, em especial, a Grazi pelas longas e boas conversas pós-expediente.

Aos Istepôs, pelos momentos de descontração.

Aos colegas do laboratório, pelas conversas esclarecedoras, ajuda fundamental e incondicional e pelas noites no laboratório, em especial, a May, Hadja, Matheus e Marcello, sem eles a realização desse trabalho não teria sido possível.

À Bióloga Larissa Juk por estar presente nessa minha caminhada pela entomologia forense do início ao fim.

A Dr.^a Cecília Kosmann, por, há muito tempo, ter movido o Carlos a pensar em trabalhar com entomologia forense e por, atualmente, estar sempre à disposição para obtermos a referência desejada, para indicar o melhor método e esclarecer as dúvidas mais profundas..."*menos as sobre a vida!*"

Ao Prof. Carlos, por ter sido de fato "*o caminho, a verdade e a salvação!*".

RESUMO

Estudos que acompanham o desenvolvimento pós-embrionário de insetos de interesse à entomologia forense, sob o efeito de fatores variáveis, são de suma importância para que essa ciência possa ser empregada em casos judiciais, auxiliando sobretudo na estimativa do Intervalo Pós-Morte (IPM). A espécie *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) tem sido apontada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Transmissores de Hematozoários do Depto de MIP/CCB/UFSC como sendo frequente colonizadora de cadáveres na região da Grande Florianópolis. Fato que levou à elaboração do presente trabalho, o qual teve por objetivo determinar a duração dos estágios de imaturos de *C. megacephala*, bem como analisar o efeito de baixas temperaturas sobre a eclosão dos ovos. Os imaturos foram criados em dieta natural de carne bovina moída e submetidos à temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo e umidade naturais (14 h claro/10 h escuro e 70% de UR). Sob essas condições, o tempo mínimo de desenvolvimento (oviposição–emergência dos adultos) observado para a espécie foi de 258 horas (10,75 dias), sendo que o período de incubação dos ovos foi de 16 horas. Após 32 horas da postura dos ovos foi registrado o estágio de muda (farado) do 1º/2º ínstar larval. Decorridas 36 horas registrou-se a presença de larvas em 2º ínstar. O segundo estágio de muda (farado 2º/3º ínstar) foi registrado após 50 horas. Larvas em 3º ínstar foram observadas após 54 horas. O estágio de pré-pupa começou a ser observado após 114 horas. As primeiras pupas foram registradas decorridas 126 horas. Ovos de *C. megacephala* mantidos em câmara climatizadora regulada a baixas temperaturas constantes (15 ± 1 °C, 13 ± 1 °C, $12,5 \pm 1$ °C e 10 ± 1 °C) e à umidade relativa a natural, não foram capazes de eclodir durante as 32 horas de exposição a essas condições. Após esses ovos serem expostos à temperatura ambiente (25 ± 2 °C), fotoperíodo e umidade naturais, apenas os ovos submetidos à temperatura de 10 °C não foram capazes de eclodir. Assim, nossos resultados sugerem que nas condições estudadas, os ovos de *C. megacephala* são inviáveis à temperatura abaixo de 10 °C.

Palavras-chave: Desenvolvimento Pós-Embrionário, Entomologia Forense, Intervalo Pós-Morte.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Exemplar de *Chrysomya megacephala* e detalhe dos olhos do macho e da fêmea (Fonte: modificado de Cook Islands Biodiversity & Natural Heritage)..... 18
- Figura 2. Esqueletos cefalofaríngeos de *Chrysomya megacephala* em vista lateral característicos de cada ínstar larval. 1A: Larva em 1º ínstar. 1B: Farado 1º/2º ínstar. 1C: Larva em 2º ínstar. 1D: Farado 2º/3º ínstar. 1E: Larva em 3º ínstar. Legenda: A = maxila; B = mandíbula; C = esclerito hipostomal; D = esclerito hipofaríngeano; e = depressão ocular; F = clipeo; G = arco clipeal; H = esclerito infrafaríngeano; I = esclerito faríngeano; J = incisão média; L = corno ventral; M = corno dorsal; N = esclerito dental; O = esclerito labial; P = esclerito acessório; a = maxila e mandíbula em formação (Fonte: Extraído de Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2008)..... 20
- Figura 3. Espiráculos anteriores e posteriores característicos de cada estágio larval de *Chrysomya megacephala*. 2A: Espiráculo anterior de larva em 2º ínstar. 2B: Espiráculo anterior de larva em 3º ínstar. 2D: Espiráculo posterior de 1º ínstar. 2E: Espiráculo posterior de farado 1º/2º ínstar. 2F: Espiráculo posterior de larva em 2º ínstar. 2G: Espiráculo posterior de farado 2º/3º ínstar. 2H: Espiráculo posterior de larva em 3º ínstar (Fonte: modificado de Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2008)..... 21
- Figura 4. Montagem da armadilha: a) garrafas cortadas; b) peças superiores acopladas; c) recipiente com a isca; d) disposição da isca na peça inferior da armadilha; e) armadilha montada..... 25
- Figura 5. Método de retirada dos indivíduos vivos da armadilha..... 27
- Figura 6. Gaiola de criação dos adultos..... 28
- Figura 7. Gráfico da porcentagem de novas pupas de *Chrysomya megacephala* observadas a cada período de 12 horas, entre os registros das primeiras e últimas pupas. Larvas criadas

em dieta de carne bovina e à temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com
fotoperíodo e umidade naturais..... 34

Figura 8. Gráfico da comparação do tempo de duração dos estágios
imaturos de *Chrysomya megacephala*, representado pela
duração mínima em horas de cada fase. Imaturos criados em
dieta de carne bovina e à temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com
fotoperíodo e umidade naturais..... 35

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Tempo de desenvolvimento dos imaturos, em horas, de *Chrysomya megacephala*, representado pela duração máxima e mínima de cada fase, bem como pelo tempo mínimo acumulado a cada ínstar desde a oviposição. Indivíduos criados em dieta de carne bovina e à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais..... 31
- Tabela 2. Desenvolvimento dos imaturos de *Chrysomya megacephala*, representado pelo período, em horas, e pelo tamanho das larvas, em mm, de cada ínstar. Indivíduos criados em dieta de carne bovina e à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais..... 32
- Tabela 3. Comprimento das larvas, em mm, de *Chrysomya megacephala*, em função do tempo, em horas. Imaturos criados em dieta de carne bovina e à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais..... 33
- Tabela 4. Desenvolvimento do 3º ínstar de *Chrysomya megacephala* subdividido em 4 grupos representados pela duração, em horas, e pelo tamanho das larvas, em mm. Indivíduos criados em dieta de carne bovina e à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais..... 34
- Tabela 5. Comparação entre o tempo de desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala*, em dias, a diferentes temperaturas, obtido no presente trabalho e por outros autores..... 38
- Tabela 6. Comparação entre o tempo de desenvolvimento acumulado dos imaturos de *Chrysomya megacephala*, em dias, a diferentes temperaturas, obtido no presente trabalho e por outros autores..... 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- DP – Desvio Padrão;
- GDA – Graus Dias-Acumulados;
- IV – Intervalo de Variação;
- IPM – Intervalo Pós-Morte.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| RESUMO..... | 05 |
| INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 1.1 BIOLOGIA DOS INSETOS E SUA CORRELAÇÃO COM A ESTIMATIVA DE IPM..... | 16 |
| 1.2 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE <i>CHRYSOMYA</i> <i>MEGACEPHALA</i> (FABRICIUS, 1794)..... | 17 |
| 2 OBJETIVOS..... | 23 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL..... | 23 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 23 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 25 |
| 3.1 CONFEÇÃO DAS ARMADILHAS..... | 25 |
| 3.2 INSTALAÇÃO DAS ARMADILHAS..... | 25 |
| 3.3 ESTABELECIMENTO E MANUTENÇÃO DA COLÔNIA..... | 36 |
| 3.4 DETERMINAÇÃO DA DURAÇÃO DAS FASES DO CICLO DE VIDA E COMPRIMENTO DOS IMATUROS CRIADOS À TEMPERATURA AMBIENTE..... | 28 |
| 3.5 OBSERVAÇÃO DO EFEITO DE BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE A ECLOSÃO DOS OVOS..... | 29 |
| 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 30 |
| 4 RESULTADOS..... | 31 |
| 4.1 DESENVOLVIMENTO DE OVO A ADULTO..... | 31 |
| 4.2 EFEITO DE BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE A ECLOSÃO DOS OVOS..... | 35 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 37 |
| CONCLUSÕES..... | 45 |
| REFERÊNCIAS..... | 47 |

INTRODUÇÃO

A entomologia é a ciência que se ocupa dos estudos dos insetos (Classe Insecta), sendo parte da arthropologia. O desenvolvimento no campo da entomologia sempre esteve atrelado a avanços nos campos da agricultura, engenharia e durante muitos anos os insetos foram conhecidos sobretudo por serem pragas de culturas e transmissores de agentes causadores de doenças (Pujol-Luz *et al.* 2008, Oliveira-Costa 2011).

Desde 1850, pesquisas que aplicam os estudos dos insetos e de outros artrópodes aos procedimentos legais vêm sendo realizadas e a esse campo da ciência deu-se o nome de entomologia forense (Pujol-Luz *et al.* 2008, Oliveira-Costa 2011). No Brasil, os primeiros trabalhos em entomologia forense correspondem a levantamentos de fauna cadavérica realizados em Mata Atlântica pelos pesquisadores Edgard Roquette Pinto e Oscar Freire na primeira década do século XX (Pujol-Luz *et al.* 2008). Nos anos seguintes raras foram as pesquisas nesse campo da ciência, sendo retomadas em quantidade expressiva apenas na segunda metade do século XX (Pujol-Luz *et al.* 2008). Atualmente, poucos são os entomologistas que dedicam-se a ciência forense em nosso país, os quais vêm desenvolvendo suas pesquisas apenas em carcaças animais não humanas, em razão de entraves jurídicos, visando extrapolar os resultados para cadáveres humanos (Oliveira-Costa 2011). Pujol-Luz *et al.* (2008) mencionam que no Brasil existem oito grupos acadêmicos desenvolvendo trabalhos em entomologia forense, os quais estão localizados no Amazonas, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte e São Paulo. No estado de Santa Catarina, os primeiros passos para o desenvolvimento da entomologia forense vêm sendo dado por pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e o primeiro trabalho tratou-se de um levantamento de fauna entomológica em carcaça de suíno em área de Mata Atlântica (Juk 2013).

A entomologia forense possui três subáreas, conforme classificado por Lord & Stevesson (1986): (1) Urbana – auxilia na resolução de disputas judiciais cíveis em que a presença de insetos em bens culturais, imóveis ou estruturas cause prejuízo a uma das partes do processo; (2) Produtos armazenados – ocupa-se de questões envolvendo a contaminação por insetos, em pequena ou grande extensão, de produtos comerciais estocados; (3) Médico-legal – utiliza-se da fauna de insetos necrófagos para a resolução de casos de morte violenta, contribuindo sobretudo em investigações da cronotanatognose, que corresponde ao intervalo de tempo entre a exposição do cadáver ao ambiente e a data em que foi encontrado – também conhecido por Intervalo Pós-Morte (IPM) (Pujol-Luz *et al.* 2008,

Oliveira-Costa 2011). Sendo esta, a subárea de interesse do presente trabalho.

Dentre os insetos necrófagos colonizadores de carcaças, os dípteros, representados pelas moscas, e coleópteros, representados pelo besouros, se destacam (Carvalho & Linhares 2001, Turchetto & Vanin 2004, Pujol-Luz *et al.* 2008). Oliveira-Costa (2011) esclarece que logo que se inicia o processo de decomposição, derivados líquidos e voláteis são formados, atraindo os artrópodes que colonizarão a carcaça. Segundo Souza *et al.* (2011) as moscas chegam aos corpos em decomposição graças a estruturas capazes de sentir os odores específicos da decomposição a longas distâncias.

1.1 BIOLOGIA DOS INSETOS E SUA CORRELAÇÃO COM A ESTIMATIVA DE IPM

O IPM obtido por método entomológico pode ser estimado com base no estágio de desenvolvimento dos insetos imaturos coletados no cadáver ou com base na sucessão de insetos que o colonizam (Oliveira-Costa 2011, Voss *et al.* 2011). Para tanto, compreender a biologia dos insetos é de suma importância (Pujol-Luz *et al.* 2008, Yang & Shiao 2012). Pois, apesar de estudos de levantamento de fauna serem essenciais à entomologia forense, seus resultados não podem ser por si só aplicados à estimativa de IPM. Desse modo, estudos de levantamento de fauna cadavérica devem ser seguidos de pesquisas acerca da biologia, ciclo de vida e ecologia das espécies apontadas como de interesse forense, sobretudo nas regiões tropicais onde não se observa um padrão constante de sucessão de insetos (Pujol-Luz *et al.* 2008).

Yang & Shiao (2012), por exemplo, afirmam que compreender o processo de oviposição é de suma importância, visto ser este o primeiro passo para a colonização de um corpo por moscas, sendo, portanto, um dos conhecimentos basais para o início da utilização de dados de desenvolvimento de insetos na estimativa do IPM.

Segundo Richards & Villet (2008), o IPM corresponde à duração do desenvolvimento de ovo até a fase em que se encontra o imaturo mais velho encontrado da cena de crime – sendo este o IPM mínimo – mais o tempo transcorrido entre a morte e a postura dos ovos do inseto sobre o cadáver. A fim de assegurar a veracidade das informações presentes nos laudos periciais, entomologistas forenses restringem-se a estimar o IPM mínimo (Kosmann *et al.* 2011), pois não existem parâmetros científicos para se estimar o tempo decorrido entre o momento da morte e a exposição do cadáver ao ambiente.

O tempo de desenvolvimento dos insetos é influenciado por vários fatores (Crystal 1967, Cabral *et al.* 2007, Pires *et al.* 2009, Oliveira-Costa 2011, Souza *et al.* 2011, Pinheiro *et al.* 2012), mesmo assim Souza & Kirst (2010) acreditam que a utilização de Diptera consiste na melhor maneira de se estimar o IPM aplicando-se a entomologia forense. Porém, segundo os mesmos autores, para resultados mais fidedignos deve-se observar também a colonização dos demais grupos de insetos no cadáver.

Segundo Marchenko (2001), o ciclo de vida dos insetos é regulado sobretudo por parâmetros térmicos, os quais são espécie-específico. Alguns autores ainda defendem que as investigações a respeito da biologia das espécies devem considerar não só a variabilidade entre espécies, mas também entre populações (Ames & Tuner 2003, Bourel *et al.* 2003). Fato este que justifica a realização de estudos regionais sobre o tempo de desenvolvimento dos insetos (Souza & Kirst 2010, Pinheiro *et al.* 2012). Souza & Kirst (2010) afirmam que a temperatura é o fator responsável pela maior variação no tempo de desenvolvimento dos insetos imaturos, reduzindo ou acelerando a taxa de desenvolvimento. Por isso, a necessidade de se realizar experimentos que observem o desenvolvimento dos insetos de interesse forense a diferentes temperaturas.

1.2 ASPECTOS RELEVANTES SOBRE *CHRYSOMYA MEGACEPHALA* (FABRICIUS, 1794)

As famílias de dípteros de maior importância forense são Calliphoridae, Muscidae, Fanniidae e Sarcophagidae (Greenberg 1991, Catts & Goff 1992, Carvalho *et al.* 2000). No Brasil, dentre os gêneros da família Calliphoridae, *Chrysomya* destaca-se pelas espécies *Chrysomya albiceps* (Wiedemann, 1819), *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Figura 1), *Chrysomya putoria* (Wiedemann, 1818) e *Chrysomya rufifacies* (Macquart, 1843). Moscas do gênero *Chrysomya* invadiram o Novo Mundo na década de 70 (Guimarães *et al.* 1978, 1979, Prado & Guimarães 1982, Laurence 1986) e, atualmente, encontram-se amplamente distribuídas pelas Américas (Kosmann 2013). Estudos recentes apontam a presença de *C. megacephala* na Argentina (Olea *et al.* 2011) e pela primeira vez alcançando o estado de Indiana (EUA) (Picard 2013). O primeiro trabalho de investigação de fauna necrófaga, em carcaça suína, realizado em Santa Catarina aponta *C. megacephala* como umas das espécies mais frequentes (Juk 2013). A espécie é um tipo de mosca varejeira, como são conhecidos popularmente os califorídeos, e é encontrada associada à matéria orgânica e a corpos em decomposição (Von Zuben 1993, Ruiz 2007, Oliveira-Costa 2011, Linhares & Thyssen 2012).

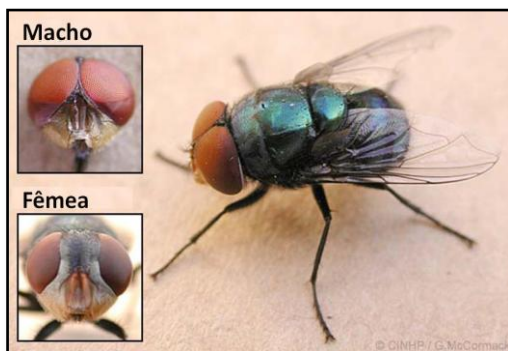


Figura 1. Exemplar de *Chrysomya megacephala* e detalhe dos olhos do macho e da fêmea (Fonte: modificado de Cook Islands Biodiversity & Natural Heritage).

Indivíduos de *C. megacephala* são registrados nas regiões afrotropical, australiana e oriental (Prins 1982, Linhares & Thyssen 2012) atuando em alguns locais como polinizadores (Anderson *et al.* 1982), como vetores de ovos de helmintos (Sulaiman *et al.* 1988, 1989), causadores de miíases em humanos (Sukontason *et al.* 2005) e associados a matéria orgânica em decomposição (Sukontason *et al.* 2008). No Brasil, além de ser importante indicador forense, *C. megacephala* também representa risco à saúde humana por ter sido apontada como causadora de miíases em humanos (Ferraz *et al.* 2010) e vetor mecânico de agentes causadores da doença diarreica aguda (DDA) (Oliveira *et al.* 2006, Kosmann 2013), fato que se agrava pôr a espécie estar bem adaptada a ambientes urbanos (Kosmann 2013), locais com grande concentração populacional.

A espécie *C. megacephala* possui desenvolvimento holometábolo, característica comum aos dípteros, e, assim como as demais espécies de Calliphoridae, seu ciclo de vida apresenta estágio de ovo, três estádios larvais, um pupal e a fase de adulto (Souza & Kirst 2010). No entanto, alguns autores classificam o desenvolvimento larval de califorídeos em seis estádios: larva 1º ínstar; farado 1º/2º ínstar; larva 2º ínstar, farado 2º/3º ínstar; larva 3º ínstar; e pré-pupa (Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2010, Barros-Cordeiro 2011). A classificação em seis estágios larvais baseia-se no fato de serem observadas diferenças morfológicas e comportamentais entre essas fases do desenvolvimento larval (Kamal 1958). A entomologia forense utiliza-se dessas diferenças para delimitar de forma mais precisa

possível o momento do desenvolvimento que um imaturo coletado na cena de crime está, ou seja, estimar com mais precisão a idade desse imaturo.

Os ovos de *C. megacephala* são pequenos, translúcidos e apresentam estreitamentos nas duas extremidades (Prins 1982). Após a eclosão dos ovos iniciam-se os estádios larvais, os quais se diferenciam principalmente por características morfológicas dos espiráculos anteriores e posteriores e pelo arranjo, esclerotização e pigmentação do esqueleto cefalofaríngeo (Prins 1982, Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2010). As larvas que deixam os ovos logo após a eclosão correspondem a larvas de 1º ínstar, as quais nos primeiros instantes de vida são denominadas neolarvas (Costa & Ide 2006).

As características morfológicas de *C. megacephala* foram descritas de forma bem detalhada pelos autores Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010), inclusive com ilustrações e imagens (Figuras 2 e 3). Segundo esses autores, as larvas de 1º ínstar possuem o esqueleto cefalofaríngeo pouco pigmentado, mandíbula menor, menos esclerotizada e pigmentada que a maxila e o par de espiráculos posteriores, localizado no último segmento abdominal, apresenta apenas uma abertura espiracular. O estágio seguinte corresponde ao período de transição para o início do 2º ínstar larval e é denominado farado 1º/2º ínstar. Esse período de muda é caracterizado presença simultânea do par de espiráculos posteriores de 1º e 2º ínstar, este com duas aberturas espiraculares, e pela formação do espiráculo anterior, localizado próximo ao segundo segmento torácico. Finalizada a muda, inicia-se o 2º ínstar larval, durante o qual as larvas apresentam espiráculos posteriores com duas aberturas espiraculares, espiráculos anteriores, mandíbula fusionada à maxila e esta fortemente esclerotizada e pigmentada. O segundo período de muda é denominado farado 2º/3º ínstar larval e caracteriza-se pela presença simultânea do par de espiráculos posteriores de 2º ínstar e 3º ínstar, este com três aberturas espiraculares, bem como pela presença de espiráculos anteriores de 3º ínstar, os quais são maiores e largos na base. As larvas de 3º ínstar apresentam o esqueleto cefalofaríngeo completamente formado e um par de espiráculos anteriores e espiráculos posteriores ambos de 3º ínstar.

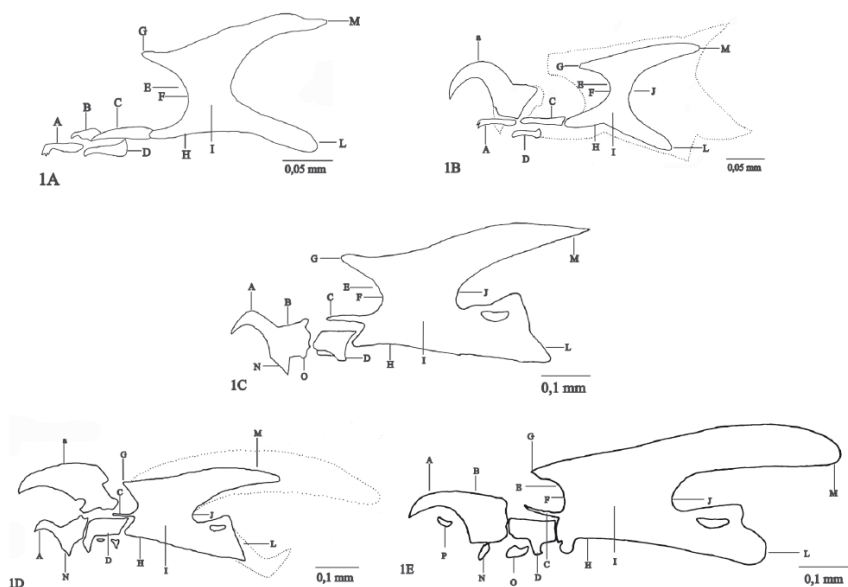
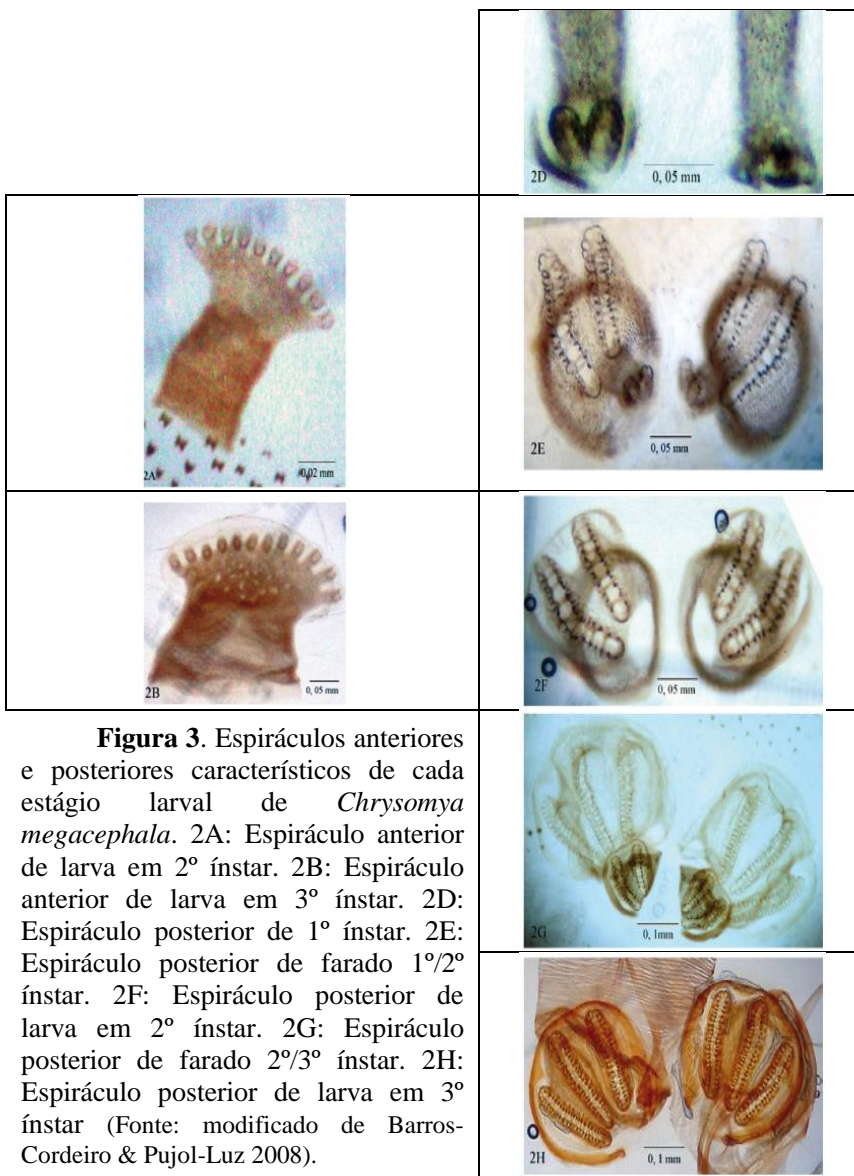


Figura 2. Esqueletos cefalofaríngeos de *Chrysomya megacephala* em vista lateral característicos de cada ínstar larval. 1A: Larva em 1º ínstar. 1B: Farado 1º/2º ínstar. 1C: Larva em 2º ínstar. 1D: Farado 2º/3º ínstar. 1E: Larva em 3º ínstar. Legenda: A = maxila; B = mandíbula; C = esclerito hipostomal; D = esclerito hipofaríngeano; e = depressão ocular; F = clipeo; G = arco clipeal; H = esclerito infrafaríngeano; I = esclerito faríngeano; J = incisão média; L = corno ventral; M = corno dorsal; N = esclerito dental; O = esclerito labial; P = esclerito acessório; a = maxila e mandíbula em formação (Fonte: Extraído de Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2008).



O sexto e último estágio larval é denominado pré-pupa pelo fato de tratar-se de um momento de preparação para o imaturo empupar (Costa & Ide 2006). Durante esse estágio as larvas abandonam a dieta e diminuem a

sua atividade (Kamal 1958). Ocorrem mudanças fisiológicas que levam à desidratação (Linhares & Thyssen 2012, Marques 2012), concomitantemente à diminuição do tamanho corpóreo (Barros-Cordeiro & Pujol-Luz 2010).

O estágio de pupa é caracterizado pela formação do pupário, que corresponde ao endurecimento da cutícula do 3º ínstar larval (Mello-Patiu & Silva 2011). O pupário é imóvel e em seu interior a pupa sofre grandes transformações fisiológicas e morfológicas que levarão à emergência do adulto (Costa & Ide 2006). O pupário de *C. megacephala* possui coloração marrom-avermelhada e é bastante semelhante ao de outras espécies de Calliphoridae (Prins 1982).

Apesar de existirem chaves taxonômicas para imaturos de Diptera (Costa & Ide 2006), a determinação de espécies através dessa etapa do ciclo de vida dos insetos é bastante trabalhosa e desempenhada de forma segura por poucos profissionais, por isso, quando possível, opta-se pela criação dos imaturos em laboratório até a emergência dos adultos, para que então a espécie seja determinada.

Com base no exposto e pelo fato de levantamentos de entomofauna na região da grande Florianópolis apontarem *C. megacephala* como frequente colonizadora de cadáveres, buscou-se estimar o tempo necessário para o desenvolvimento dos estágios larval e pupal, a influência da temperatura na eclosão dos ovos e correlacionar os com a estimativa do IPM.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estimar a duração dos estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *C. megacephala* em temperatura ambiente e observar influência de baixas temperaturas na eclosão dos ovos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estabelecer uma colônia de *C. megacephala* no insetário do Laboratório de Transmissores de Hematozoários do Depto de MIP/CCB/UFSC a partir de insetos capturados em campo;
- ✓ Determinar o tempo de desenvolvimento de cada fase do ciclo de vida do inseto até a emergência à temperatura ambiente (25 ± 2 °C);
- ✓ Determinar o tamanho das larvas de *C. megacephala* a cada ínstar, quando mantidas à temperatura ambiente (25 ± 2 °C);
- ✓ Submeter ovos de *C. megacephala* a temperaturas constantes de 15 ± 1 °C, 13 ± 1 °C, $12,5 \pm 1$ °C e 10 ± 1 °C, por 32 horas, e observar o efeito sob a eclosão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONFECÇÃO DAS ARMADILHAS

Foi usada uma modificação da técnica descrita por Ferreira (1978). Para a confecção de cada armadilha foram utilizadas 2 garrafas plásticas do tipo PET. Ambas as garrafas foram cortadas em 2 peças, uma garrafa próximo ao fundo e outra próximo ao gargalo (Figura 4 - a). A peça superior menor, sem a tampa, foi encaixada no interior da peça superior maior, que foi tampada, a fim de criar um ambiente no qual os espécimes capturados permanecessem aprisionados (Figura 4 - b). Foram feitas quatro pequenas aberturas nas laterais da peça inferior e nela colocados os recipientes com as iscas (Figura 4 - d). A peça inferior foi fixada à parte superior da armadilha com fita adesiva (Figura 4 - e).

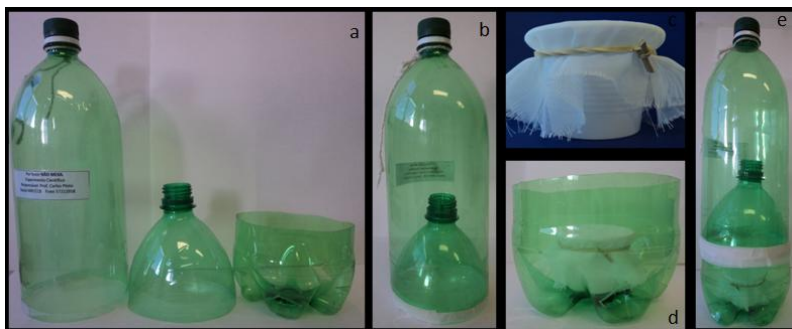


Figura 4. Montagem da armadilha: a) garrafas cortadas; b) peças superiores acopladas; c) recipiente com a isca; d) disposição da isca na peça inferior da armadilha; e) armadilha montada.

Foi utilizada como isca carne bovina moída em início de decomposição (exposta à temperatura ambiente por 48 horas). Em cada armadilha, foi colocada cerca de 30 g de carne bovina em copos plásticos de 50 ml. Esses copos foram cobertos com tecido do tipo voal, preso com elástico (Figura 4 - c), a fim de impedir a oviposição na isca. Os copos contendo as iscas foram presos às armadilhas com fita adesiva dupla face.

3.2 INSTALAÇÃO DAS ARMADILHAS

As armadilhas foram instaladas aos arredores do prédio do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB), localizado no campus da

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no bairro Córrego Grande, município de Florianópolis.

Sempre que se desejou capturar adultos de *C. megacephala*, eram utilizadas 10 armadilhas de garrafas plásticas - PET. Essas armadilhas eram dispostas aleatoriamente na área de coleta, penduradas com barbante à altura aproximada de 1,30 m do solo e revisadas a cada período de 24 horas, por 5 dias consecutivos.

3.3 ESTABELECIMENTO E MANUTENÇÃO DA COLÔNIA

A colônia foi formada por indivíduos adultos selvagens de *C. megacephala* e por suas primeiras proles, as quais foram introduzidas na colônia após a emergência dos juvenis. Novos adultos selvagens de *C. megacephala* foram acrescentados à colônia uma vez por mês e procurou manter-se densidade máxima de 200 indivíduos por viveiro, com proporção sexual de 1 macho para cada fêmea.

A técnica de coleta utilizada trata-se de um método de captura seletiva de espécies que são atraídas pelo odor da carne em decomposição, porém não da captura exclusiva da espécie de interesse. Por esse motivo, no laboratório, primeiramente eram selecionados os indivíduos muscóides com abdômen e tórax metálicos. Esses indivíduos eram retirados das peças superiores das armadilhas vedando-se as saídas inferiores com algodão e acoplando-se tubos plásticos às saídas superiores (Figura 5). Após os indivíduos migrarem para os tubos plásticos, eram transferidos para uma gaiola de acrílico transparente. A gaiola, com dimensão de 39 x 39 x 39 cm, possuía quatro aberturas: 1 em cada lateral, vedadas com tecido do tipo voal para ventilação, e 2 aberturas circulares na face anterior, cada uma com 1 manga, que permitiam o acesso ao interior da gaiola (Figura 6). Essa gaiola foi denominada “gaiola de triagem”, pois os espécimes permaneciam nela de 24 a 48 horas, quando então eram retirados para a identificação específica. Esse intervalo foi adotado levando-se em consideração que o processo de coleta - identificação é estressante para o inseto e caso a determinação específica fosse realizada na sequência da captura poderia aumentar a mortalidade de indivíduos.



Figura 5. Método de retirada dos indivíduos vivos da armadilha.

Para proceder à identificação específica dos espécimes da gaiola de triagem, estes eram introduzidos individualmente em tubos plásticos com tampa e colocados no *freezer* à temperatura aproximada de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 90 segundos aproximadamente, até que os espécimes ficassem imóveis, a fim de facilitar a manipulação. Os indivíduos eram transferidos para placas de Petri e analisados rapidamente em microscópio estereoscópico de luz. Para determinar se o indivíduo pertencia à espécie *C. megacephala* seguiu-se a ordem de caracteres apresentados nas chaves dicotômicas de Mello (2003) e Carvalho & Mello-Patiu (2008). Sendo esses caracteres os seguintes: nervura mediana distintamente angulosa; base da nervura radial pilosa dorsalmente; tórax e abdome metálico nas cores azul ou verde; calíptera pilosa e presença de estigma respiratório torácico anterior cinzento. Os indivíduos pertencentes à espécie de interesse eram então quantificados, sexados e transferidos para outra gaiola idêntica à anterior, a qual foi denominada gaiola de criação (Figura 6). A sexagem dos indivíduos era feita a olho nu, pois os machos de *C. megacephala* são holópticos e fêmeas são dicópticas (Figura 1). As gaiolas foram mantidas à temperatura de $25 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo e umidade naturais (14 h claro/10 h escuro e 70% de UR). Aos indivíduos adultos era oferecido algodão umedecido com água destilada e dieta à base de açúcar, leite em pó e levedo de cerveja, o mesmo volume dos referidos ingredientes era misturado à água destilada, até se obter uma textura pastosa. Além disso, fígado de frango macerado cru era oferecido como dieta aos juvenis. Sempre que se desejava obter ovos eram oferecidos 50 g de carne bovina moída crua. A carne era colocada no viveiro no período matutino e retirada na mesma noite, havendo ou não postura de ovos, evitando-se assim a eclosão de larvas no interior das gaiolas, bem como o ressecamento da carne. As gaiolas tinham seus fundos

forrados com papel filtro e a substituição desses, a higienização das gaiolas com algodão umedecido em água, bem como a reposição da dieta e da água para hidratação ocorria a cada dois dias.



Figura 6. Gaiola de criação dos adultos.

3.4 DETERMINAÇÃO DA DURAÇÃO DAS FASES DO CICLO DE VIDA E COMPRIMENTO DOS IMATUROS CRIADOS À TEMPERATURA AMBIENTE

Foi colocada carne moída crua em início de decomposição na gaiola de criação de *C. megacephala* e a colônia foi observada a cada 1 hora para registrar o momento da oviposição. As massas de ovos obtidas foram retiradas da carne com pincéis finos molhados com água destilada e transferidas para placas de Petri forradas com papel filtro também umedecido com água destilada. Os ovos foram observados a cada período de 1 hora para saber o momento da eclosão e considerar este momento como a hora 0 (hora zero). Após a eclosão, as neolarvas foram contadas e transferidas com o auxílio de pincéis para copos plásticos de 50 ml, contendo dieta composta 100% de carne bovina moída crua. Foi respeitada a proporção de 1 g de dieta/larva, conforme adotado por Queiroz & Milward-de-Azevedo (1991). Os recipientes com dieta e neolarvas foram colocados em copos plásticos maiores devidamente identificados, cobertos por tecido do tipo voal preso com elástico e que tinham 1/3 de seu volume preenchido por serragem autoclavada e umedecida com água destilada, para criar ambiente propício à pupação.

Amostras de 10 larvas foram coletadas a cada período de 2 horas, a partir da hora 0 até a 50^a hora. Após a 50^a hora até a 134^a hora, as coletas ocorreram a cada período de 12 horas. Após a 134^a hora deixou-se de se

coletar larvas, porém a fim de estimar a duração dos estágios de pré-pupa e pupa, observações prosseguiram sendo feitas a cada período de 12 horas, até a 410^a hora.

O procedimento de coleta das larvas para a mensuração do comprimento e identificação do estágio de desenvolvimento consistiu na retirada aleatória, a cada período de coleta, de 10 copos. Cada copo teve seu conteúdo depositado em uma placa de Petri e com a ajuda de pincéis finos úmidos procedeu-se a busca por larvas, sendo retirada a primeira larva avistada em cada um dos 10 copos. As larvas coletadas foram submersas em água quente (entre 80 °C e 90 °C) para morrerem distendidas, a fim de possibilitar a correta medição do tamanho corpóreo, e foram conservadas em álcool 70%. Após a coleta das larvas, os conteúdos depositados nas placas de Petri (dieta mais as larvas restantes) retornavam para os seus respectivos copos, para que pudessem ser utilizados no próximo momento de coleta.

Posteriormente, foram identificados os estágios de desenvolvimento pós-embrionário de cada larva de acordo com Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010) (Figuras 2 e 3), através da observação dos espiráculos posteriores e do esqueleto cefalofaríngeo ao microscópio estereoscópico de luz. Quando necessário, para melhor observação dessas partes, as amostras foram clareadas através da imersão em hidróxido de potássio (KOH) a 10%. O comprimento corpóreo larval foi mensurado com o auxílio de um paquímetro digital, a fim de relacionar essa medida com o estágio de desenvolvimento larval.

Para estimar a duração do estágio pupal, a cada período de coleta/observação as novas pupas eram separadas em potes plásticos e agrupadas de acordo com a hora em que foram observadas pela primeira vez. Esses potes também eram observados a cada período de 12 horas, para se estabelecer o intervalo de emergência de cada pupa.

3.5 OBSERVAÇÃO DO EFEITO DE BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE A ECLOSÃO DOS OVOS

Foram separadas 10 massas de ovos, provenientes de posturas feitas por fêmeas da colônia de criação, mantidas à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais. Cada massa de ovos foi dividida ao meio com o auxílio de estilete e pincel fino e macio. As metades das massas de ovos foram individualizadas em placas de Petri, sendo uma metade considerada o grupo controle, mantida à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais, e a outra metade mantida em câmara climatizadora regulada a baixas temperaturas constantes (15 ± 1 °C, $13 \pm$

1°C, $12,5 \pm 1^\circ\text{C}$ e $10 \pm 1^\circ\text{C}$) e à umidade relativa a natural. As placas de Petri com as massas de ovos submetidas a baixas temperaturas foram forradas com papel filtro embebido em água destilada.

Todos os ovos foram analisados em microscópio estereoscópio de luz após 17, 24 e 32 horas do registro da postura, a fim de ser observar se houve ou não eclosão.

Para diferenciar as temperaturas que levam os espécimes de *C. megacephala* a entrar em diapausa das temperaturas que impossibilitam a continuidade do ciclo de vida do inseto, os ovos mantidos a baixas temperaturas que não eclodiram após 32 horas da oviposição foram retirados da câmara climatizadora e mantidos à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com fotoperíodo e umidade naturais por 24 horas. Os ovos que passaram por este procedimento e vieram a eclodir foram considerados em diapausa na temperatura que se encontravam anteriormente.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As médias foram comparadas através do teste T de Student, considerando-se significativas as diferenças com $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DE OVO A ADULTO

O tempo mínimo de desenvolvimento observado para a espécie *C. megacephala* da fase de ovo até a emergência dos primeiros adultos foi de 258 horas (10,75 dias), à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais (Tabela 1).

Tabela 1. Tempo de desenvolvimento dos imaturos, em horas, de *Chrysomya megacephala*, representado pela duração máxima e mínima de cada fase, bem como pelo tempo mínimo acumulado a cada ínstar desde a oviposição. Indivíduos criados em dieta de carne bovina e à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais.

| Fases | Duração máxima | Duração mínima | Tempo mínimo acumulado |
|---------------------|----------------|----------------|------------------------|
| Ovo | 16 | — | — |
| Larva 1º ínstar | 18 | 16 | 16 |
| Farado 1º/2º ínstar | 14 | 4 | 32 |
| Larva 2º ínstar | 16 | 14 | 36 |
| Farado 2º/3º ínstar | 10 | 4 | 50 |
| Larva 3º ínstar | 48 | 60 | 54 |
| Pré-pupa | 96 | 12 | 114 |
| Pupa | 228 | 132 | 126 |
| Emergência | — | — | 258 |

O período de incubação dos ovos foi de 16 horas, correspondendo ao tempo transcorrido entre as observações dos primeiros ovos e das primeiras neolarvas (Tabela 1).

O período mínimo larval foi de 110 horas. Larvas em 1º ínstar foram coletadas até a 18ª hora e apresentaram comprimento corpóreo médio de $3,20 \pm 0,47$ mm (Tabela 2).

Tabela 2. Desenvolvimento dos imaturos de *Chrysomya megacephala*, representado pelo período, em horas, e pelo tamanho das larvas, em mm, de cada ínstar. Indivíduos criados em dieta de carne bovina e à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais.

| Fases | Período | Tamanho |
|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| | | Média (\pm DP) |
| Ovo | 16 ¹ | — |
| Larva 1º ínstar | 0 – 18 ^a | $3,20 \pm 0,47$ ^(a) |
| Farado 1º/2º ínstar | 16 ^a – 30 ^a | $4,09 \pm 0,53$ ^(b) |
| Larva 2º ínstar | 20 ^a – 36 ^a | $6,71 \pm 1,29$ ^(c) |
| Farado 2º/3º ínstar | 34 ^a – 44 ^a | $8,34 \pm 0,56$ ^(d) |
| Larva 3º ínstar | 38 ^a – 98 ^a | $13,60 \pm 2,33$ ^(e) |
| Pré-pupa | 98 ^a – 194 ^a | $13,31^2 \pm 1,16$ ^(e) |
| Pupa | 110 ^a – 338 ^a | — |
| Emergência - início | 242 ^a | — |

¹Duração até as primeiras eclosões; ²Média de comprimento até a 134^a hora.

A fase de farado 1º/2º ínstar foi observada da 16^a hora até a 30^a hora e apresentaram comprimento corpóreo médio de $4,09 \pm 0,53$ mm (Tabela 2).

Imaturos em 2º ínstar foram coletados entre a 20^a e 36^a hora e apresentaram comprimento corpóreo médio de $6,71 \pm 1,29$ mm (Tabela 2).

A fase de farado 2º/3º ínstar foi registrada entre a 34^a e 44^a hora e o comprimento corpóreo médio foi de $8,34 \pm 0,56$ mm (Tabela 2).

Larvas em 3º ínstar foram registradas entre a 38º e 98^a hora e apresentaram comprimento corpóreo médio de $13,60 \pm 2,33$ mm (Tabela 2). Apesar de ainda se observar algumas larvas de 3º ínstar imersas na dieta na 98^a hora, estas não foram coletadas, pois nesse momento do experimento havia pré-pupas o suficiente para se cumprir o protocolo de coleta, assim se deu preferência pela coleta dos imaturos mais velhos.

Pré-pupas foram observadas entre a 98^a e 194^a hora e apresentaram tamanho corpóreo médio de $13,31 \pm 1,16$ mm (Tabela 2). Ressalta-se que este cálculo considerou as medidas até a 134^a hora. Na 98^a hora coletou-se somente pré-pupas, nas etapas subsequentes até a 194^a hora registrou-se a presença de pré-pupas e de pupas. A partir da 146^a hora as pré-pupas deixaram de ser coletadas, pois restaram apenas 6 indivíduos nesta fase do ciclo de vida.

Na Tabela 3 são apresentadas as médias corpóreas larvais (em mm), mensuradas a cada período de 2 horas, até a 50ª hora.

Tabela 3. Comprimento das larvas, em mm, de *Chrysomya megacephala*, em função do tempo, em horas. Imaturos criados em dieta de carne bovina e à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais.

| Período | Tamanho | | |
|-----------------|---------|-----------------------|-----------------|
| | Média | \pm DP ¹ | IV ² |
| 0 | - | - | - |
| 2 ^a | 2,22 | 0,17 | 2,05 – 2,62 |
| 4 ^a | 2,50 | 0,25 | 2,05 – 2,87 |
| 6 ^a | 2,54 | 0,15 | 2,36 – 2,83 |
| 8 ^a | 2,97 | 0,18 | 2,63 – 3,19 |
| 10 ^a | 3,17 | 0,26 | 2,59 – 3,44 |
| 12 ^a | 3,35 | 0,26 | 2,72 – 3,55 |
| 14 ^a | 3,11 | 0,36 | 2,75 – 3,91 |
| 16 ^a | 3,26 | 0,13 | 2,99 – 4,00 |
| 18 ^a | 3,64 | 0,34 | 3,25 – 4,25 |
| 20 ^a | 4,22 | 0,41 | 4,03 – 5,32 |
| 22 ^a | 5,17 | 0,44 | 4,38 – 5,71 |
| 24 ^a | 5,95 | 0,58 | 4,95 – 6,55 |
| 26 ^a | 6,38 | 0,51 | 5,40 – 7,06 |
| 28 ^a | 7,24 | 1,31 | 3,68 – 8,17 |
| 30 ^a | 6,64 | 0,99 | 5,34 – 8,16 |
| 32 ^a | 7,95 | 0,53 | 7,01 – 8,61 |
| 34 ^a | 8,18 | 0,72 | 6,91 – 8,98 |
| 36 ^a | 8,47 | 0,49 | 7,02 – 8,73 |
| 38 ^a | 8,38 | 0,71 | 7,63 – 10,13 |
| 40 ^a | 9,09 | 1,22 | 7,40 – 11,42 |
| 42 ^a | 11,00 | 1,59 | 7,12 – 12,24 |
| 44 ^a | 12,18 | 1,59 | 7,91 – 13,20 |
| 46 ^a | 13,42 | 1,09 | 11,15 – 14,13 |
| 48 ^a | 14,51 | 0,87 | 12,69 – 15,02 |
| 50 ^a | 14,36 | 2,13 | 8,48 – 15,59 |

¹Descio Padrão; ²Intervalo de Variação.

Na Tabela 4 são apresentados os estágios de larva 3º ínstar e pré-pupa divididos em 4 grupos em função das médias corpóreas (em mm), mensuradas até a 50ª hora a cada 2 horas e a partir da 50ª hora a cada 12

horas. Cada grupo representa 24 horas de desenvolvimento larval, exceto o primeiro grupo que corresponde a 26 horas.

Tabela 4. Desenvolvimento do 3º ínstar de *Chrysomya megacephala* subdividido em 4 grupos representados pela duração, em horas, e pelo tamanho das larvas, em mm. Indivíduos criados em dieta de carne bovina e à temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo e umidade naturais.

| Fases | Período | Tamanho | |
|-----------------|-------------------------------------|--------------------------|------|
| | | Média | ± DP |
| Larva 3º ínstar | 38 ^a – 62 ^a | 13,09 ^(a,c,d) | 2,29 |
| Larva 3º ínstar | 74 ^a – 86 ^a | 15,25 ^(b) | 1,55 |
| Pré-pupa | 98 ^a – 110 ^a | 13,69 ^(c) | 0,99 |
| Pré-pupa | 122 ^a – 134 ^a | 12,93 ^(d) | 1,22 |

A duração mínima do estágio pupal foi de 132 horas (Tabela 1). Imaturos nessa fase do ciclo de vida foram registrados a partir da 110ª hora e pupas mais tardias permaneceram nesse estágio até a 338ª hora (Tabela 2).

Ao total foram observadas 80 pupas, das quais 14 foram observadas pela primeira vez na 110ª hora, 34 na 122ª hora, 26 na 134ª hora, 3 na 146ª hora e 1 na 158ª, 194ª e 206ª hora, conforme Figura 7.

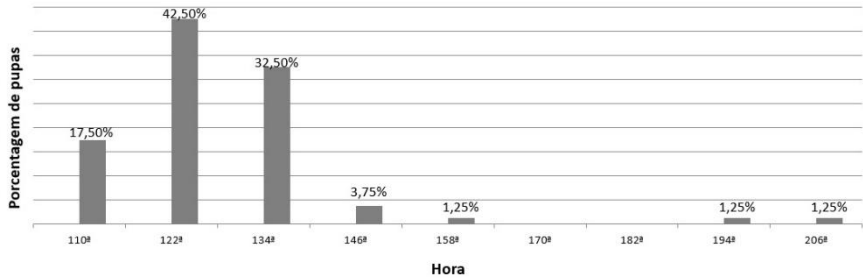


Figura 7. Gráfico da porcentagem de novas pupas de *Chrysomya megacephala* observadas a cada período de 12 horas, entre os registros das primeiras e últimas pupas. Larvas criadas em dieta de carne bovina e à temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo e umidade naturais.

As primeiras emergências foram registradas na 242ª hora (Tabela 2). A maior porcentagem de emergência foi registrada na 266ª hora (66%) e a viabilidade pupal foi de 99%.

Na Figura 8 é possível comparar a duração de cada estágio dos imaturos de *C. megacephala*.

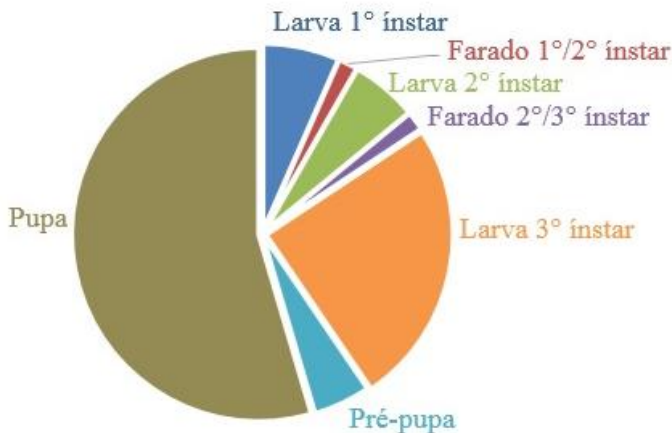


Figura 8. Gráfico da comparação do tempo de duração dos estágios imaturos de *Chrysomya megacephala*, representado pela duração mínima em horas de cada fase. Imaturos criados em dieta de carne bovina e à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais.

4.2 EFEITO DE BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE A ECLOSÃO DOS OVOS

Os ovos foram postos pelas fêmeas de *C. megacephala* principalmente no período noturno, entre 18 e 21 horas. Durante as 32 horas que os ovos foram submetidos às temperaturas de 15, 13 e $12,5 \pm 1$ °C não foram registradas eclosões. Porém, após serem retirados da câmara climatizadora e deixados à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais registrou-se eclosão para os três tratamentos.

Os ovos de *C. megacephala* submetidos à temperatura de 10 ± 1 °C, por 32 horas, foram inviáveis, pois mesmo após serem expostos por 24 horas à temperatura ambiente não houve eclosão.

5 DISCUSSÃO

Estudos focados na biologia das espécies necrófagas de interesse à entomologia forense são de suma importância (Marchenko 2001), visto serem muitos os fatores que podem influenciar e alterar a duração do desenvolvimento desses insetos (Crystal 1967, Cabral *et al.* 2007, Pires *et al.* 2009, Souza *et al.* 2011), consequentemente, levando a uma estimativa errônea de IPM.

De todos os fatores relevantes, este trabalho buscou analisar o efeito da temperatura sobre o desenvolvimento da espécie *C. megacephala*, pois conforme defendido por Souza & Kirst (2010) a temperatura é o fator mais influente sobre o metabolismo e desenvolvimento dos insetos.

Comparações feitas com trabalhos de outros autores demonstram como o período de incubação dos ovos pode variar, pois enquanto neste trabalho (25 °C) foi observado eclosão após 16 horas, Gabre e colaboradores (2005), no Egito, utilizando a temperatura de 26 °C, citam que o período de incubação dos ovos durou 1 dia, já Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010), no Brasil, sob a mesma temperatura, obtiveram o período de 15 horas. Vélez & Wolff (2008), na Colômbia, submeteram os ovos à temperatura de 23,13 °C e observaram o mesmo período de incubação dos ovos de Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010).

A aplicação da duração dos estágios de imaturos de moscas para estimar o IPM deve basear-se em estudos regionais, pois modelos de desenvolvimento realizados a diferentes latitudes podem resultar em taxas de desenvolvimento divergentes (Kamal 1958, Ames & Tuner 2003, Bourel *et al.* 2003). Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010) acompanhando o desenvolvimento de imaturos de *C. megacephala* no centro-oeste brasileiro, à temperatura de 26 °C, observaram que os estágios larvais duraram ao todo 4,08 dias e o estágio pupal 4 dias, dados diferentes dos obtidos por Gabre e colaboradores (2005) que apesar de submeter os imaturos a mesma temperatura, realizou seus experimentos no nordeste do Egito (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação entre o tempo de desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala*, em dias, a diferentes temperaturas, obtido no presente trabalho e por outros autores.

| Referência | Localidade | Temperatura ¹ | Estágio | Duração ² |
|---|------------------------------------|--------------------------|---------|----------------------|
| Presente trabalho | Florianópolis (Sul do Brasil) | 25 | Larval | 5,58 |
| | | | Pupal | 5,5 |
| Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010) | Brasília (Centro-oeste do Brasil) | 26 | Larval | 4,08 |
| | | | Pupal | 4,0 |
| Gabre <i>et al.</i> (2005) | Cairo (Nordeste do Egito) | 26 | Larval | 5,4 |
| | | | Pupal | 5,3 |
| Milward-de-Azevedo <i>et al.</i> (1996) | Rio de Janeiro (Sudeste do Brasil) | 24 | Larval | 5,05 |
| | | | Pupal | 5,7 |
| | | 30 | Larval | 4,0 |
| | | | Pupal | 3,95 |

¹Em °C; ²Em dias.

Estudos que acompanham o desenvolvimento pós-embrionário de moscas indicam que temperaturas mais elevadas aceleram a taxa de desenvolvimento (Kamal 1958, Milward-de-Azevedo *et al.* 1996, Sukontason *et al.* 2008, Thevan *et al.* 2010). Thevan e colaboradores (2010) analisaram o desenvolvimento de imaturos de *C. megacephala* à temperatura de 29 °C e registraram emergência após 9 dias de experimento, enquanto no presente trabalho, a 25 °C, as primeiras emergência foram observadas após 10,75 dias da postura dos ovos, dados que ratificam a ação esperada da temperatura sob a taxa de desenvolvimento dos imaturos de *C. megacephala*. Porém, apesar de temperaturas mais elevadas acarretarem a diminuição do tempo total de desenvolvimento dos imaturos de *C. megacephala*, é possível que os estágios larvais sejam afetados de maneira e intensidade diferentes pela temperatura, pois, conforme apresentado na Tabela 6, as primeiras fases do desenvolvimento larval foram atingidas antes pelos imaturos submetidos à temperatura de 25 °C.

Tabela 6. Comparação entre o tempo de desenvolvimento acumulado dos imaturos de *Chrysomya megacephala*, em dias, a diferentes temperaturas, obtido no presente trabalho e por outros autores.

| Referência | Temperatura ¹ | Estágio | Tempo acumulado ² |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------------|
| Presente trabalho | 25 | Ovo | 0,67 |
| | | Larva 2º ínstar | 1,5 |
| | | Larva 3º ínstar | 2,25 |
| | | Pré-pupa | 4,75 |
| | | Pupa | 5,25 |
| | | Emergência | 10,75 |
| Thevan <i>et al.</i> (2010) | 29 | Ovo | 0,8 |
| | | Larva 2º ínstar | 1,6 |
| | | Larva 3º ínstar | 3,3 |
| | | Pré-pupa | 4,5 |
| | | Pupa | 5,1 |
| | | Emergência | 9 |

¹Em °C; ²Em dias.

Os protocolos experimentais também podem influenciar no ciclo de desenvolvimento dos insetos (Bourel *et al.* 2003), pois outro fator indicado como causador de alterações na duração do ciclo de vida é o substrato utilizado por cada modelo de desenvolvimento de imaturos (Kamal 1958). No presente trabalho, as primeiras pupas foram observadas 110 horas após a eclosão dos ovos (Tabela 2). Já Souza *et al.* (2011), em Campinas/SP, apesar de submeterem suas amostras à temperatura mais elevada (27 °C), registraram o estágio de pupa após 120 horas da eclosão dos ovos, fato que pode ter ocorrido em função da dieta artificial que foi utilizada nos experimentos. No entanto, no trabalho de Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010) apesar de ser utilizada dieta artificial descrita por Estrada e colaboradores (2009), e as amostras serem submetidas à temperatura de 26 °C, semelhante à utilizada no presente trabalho (25 °C), observaram emergência de adultos de *C. megacephala* após 8,7 dias (considerando o tempo de incubação dos ovos). Sukontason e colaboradores (2008) utilizaram dieta composta prevalentemente por proteína animal (fígado de porco) e observaram, à temperatura de 25,2 °C, que o estágio de pupa foi alcançado 108 horas após a eclosão dos ovos, próximo ao registrado no presente trabalho (Tabela 2). Nos estudos de Thevan e colaboradores

(2010), a 29 °C, Gabre e colaboradores (2005), a 26 °C, e no presente estudo, a 25 °C, foi utilizada dieta composta 100% por carne bovina e foram observadas emergências após respectivamente 9 dias, 11,7 dias e 10,75 dias da postura dos ovos pelas fêmeas. Milward-de-Azevedo e colaboradores (1996) utilizaram dieta composta 100% por carne equina e observaram, à temperatura de 24 °C, que de neolarva à emergência dos adultos o tempo decorrido foi de 10,80 dias e a 30 °C o período foi de 7,92 dias.

O uso de dietas artificiais é recomendado, principalmente, pela inexistência de odor de putrefação, mas também por facilidades de estocagem e diminuição dos custos com os experimentos (Santos *et al.* 1996, Mendonça & D’Almeida 2004, Estrada *et al.* 2009, Pires *et al.* 2009). No entanto, em função do desenvolvimento dos imaturos de *C. megacephala* em condições naturais ocorrer sob matéria orgânica em decomposição e os imaturos de interesse forense desenvolverem-se principalmente sob corpos em decomposição, este estudo optou por utilizar como substrato de desenvolvimento para as larvas de *C. megacephala* carne bovina moída. Mendonça & D’Almeida (2004), investigando o desenvolvimento pós-embrionário de *C. megacephala* em diferentes dietas artificiais, observaram menor duração dos estágios larvais e pupal em carne bovina moída.

O ritmo de crescimento larval demonstrou-se intenso nas primeiras horas do desenvolvimento e regrediu ao se aproximar do estágio de pupa (Tabelas 3 e 4), o que está de acordo com o demonstrado por Barros-Cordeiro & Pujol-Luz (2010) e Thevan e colaboradores (2010). Em razão dessa característica do ciclo de vida de *C. megacephala* e conforme orientado pelas autoras Vélez & Wolff (2008), nas primeiras horas do desenvolvimento as observações foram feitas em intervalos mais curtos. Nota-se que apesar de serem observadas reduções do comprimento médio corpóreo na 14^a, 16^a, 30^a, 38^a e 50^a hora (Tabela 3), quando comparado com a média corporal do imaturo medido na hora anterior, essas reduções não apresentaram diferenças estatísticas.

Considerando ainda o comprimento médio corpóreo dos imaturos (Tabela 2), apesar de os instares larvais serem estatisticamente diferente (exceto entre as larvas de 3º instar e pré-pupas), ao analisarmos os valores absolutos das médias é possível notar que houve diferença biológica apenas entre as larvas de farado 1º/2º instar e larva 2º instar; e larvas de farado 2º/3º instar e larvas em 3º instar, ou seja, entre esses estágios larvais não houve sobreposição de tamanhos. Com base na Tabela 4, é possível notar que nem mesmo subdividindo os estágios de larva 3º instar e pré-pupa em 4 grupos, cada qual representando 24 horas de desenvolvimento, deixa-se de registrar sobreposição de tamanhos, apesar de haver diferença estatística

entre os grupos. Anderson (2000) afirma que não se deve utilizar apenas o tamanho para se estimar a idade larval, principalmente, por ter observado muita sobreposição de tamanhos entre os diferentes estágios. Vélez & Wolff (2008), à 23,13 °C, obtiveram para larva 1º ínstar, larva 2º ínstar, larva 3º ínstar e pré-pupa as seguintes medidas, respectivamente: $2,05 \pm 0,24$ mm, $5,88 \pm 1,11$ mm, $11,81 \pm 2,36$ mm e $12,95 \pm 1,29$ mm. No presente estudo obteve-se $3,20 \pm 0,47$ mm para larva 1º ínstar, $6,71 \pm 1,29$ mm para larva 2º ínstar, $13,60 \pm 2,33$ mm, para larva 3º ínstar e $13,31 \pm 1,16$ mm para pré-pupa (Tabela 2). Essas diferenças indicam que os tamanhos larvais relacionados a cada estágio de desenvolvimento de imaturos de *C. megacephala* também podem ser variáveis, assim como o tempo de duração das fases do ciclo de vida, de acordo com o substrato utilizado, temperatura de exposição, localização geográfica, entre outros fatores.

Assim, cabe ressaltar que apesar de neste trabalho haver diferença estatística entre os estágios larvais de *C. megacephala*, representados pela média corpórea dos imaturos, esse não é um bom parâmetro para auxiliar na estimativa do IPM (Wells & Kurahashi 1994). Entendimento que ressalta a importância de serem feitas minuciosas observações e registros no local de crime, principalmente quanto ao comportamento das larvas antes da coleta, visto ser de grande valor para distinguir, por exemplo, as fases de larva 3º ínstar e pré-pupa (Oliveira-Costa 2011).

O estágio de pupa, segundo Von Zuben (1993, 1998), é influenciado sobretudo pela competição por recurso alimentar durante as fases larvais. Von Zuben (1998) afirma que larvas de *C. megacephala*, criadas a 25 °C e em dieta artificial descrita por Leal e colaboradores (1982), chegam a fase pupal quando atingem peso mínimo entre 30 e 32 mg. Na Figura 7 observa-se que os imaturos de *C. megacephala* atingiram o estágio pupal em momentos diferentes, iniciando na 110ª hora. Somadas as porcentagem, é possível notar que 100% dos imaturos empuparam, fato que indica que a proporção de 1 g de dieta por larva (Queiroz & Milward-de-Azevedo 1991), utilizada no presente trabalho, oportunizou todas as larvas a atingirem o peso mínimo viável à pupação (Von Zuben 1998). A alta viabilidade pupal registrada no presente trabalho (99%) também serve de indicativo para se acreditar que a dieta oferecia aos imaturos foi suficiente para o bom andamento dos experimentos.

Compreender os processos relacionados à oviposição dos insetos necrófagos é de suma importância para a entomologia forense, visto ser esse o primeiro passo para a colonização de um corpo pelas moscas (Yang & Shiao 2012). As posturas de ovos utilizadas no presente trabalho foram

obtidas principalmente no período entre 18 e 21 horas, o que está de acordo com o relatado por Herzog e colaboradores (1992).

Segundo Bourel e colaboradores (2003) a temperatura e a umidade são os fatores mais influentes sobre o desenvolvimento embrionário de moscas. Fato que causa muito interesse, sobretudo, na aplicação da entomologia forense em regiões que registram expressiva amplitude térmica, como no caso do estado de Santa Catarina, no qual durante o inverno registra-se temperaturas muito baixas, sendo que algumas regiões podem apresentar temperaturas abaixo de 10 °C por vários dias. Mediante o exposto, investigou-se no presente trabalho se haveria eclosão dos ovos de *C. megacephala* nessas condições.

A saída das neolarvas dos ovos ocorre em função da pressão que o inseto exerce contra o interior da casca. Essa força é gerada após o inseto engolir os fluidos extraembrionários e assim possibilitar a entrada de maior volume de ar no ovo. Além disso, contrações musculares levam grandes quantidade de hemolinfa para a região cefálica, fazendo a cabeça se chocar com o córion, que se quebra, possibilitando a saída das neolarvas (Costa & Ide 2006, Marques 2012). Costa & Ide (2006) ressaltam que tal processo inicia somente após o inseto completar o seu desenvolvimento embrionário e apontam a temperatura como sendo um dos agentes externos influentes sobre o processo de ruptura.

Bourel e colaboradores (2003) explicam que é difícil saber a idade de um ovo de mosca, por isso, entomologistas costumam observar as massas de ovos até a eclosão e com base nas temperaturas às quais os ovos estiveram submetidos o período de oviposição é estimado. Contudo, devemos saber primeiramente qual a duração do desenvolvimento dos ovos da espécie de interesse sob diferentes temperaturas constantes (Bourel *et al.* 2003). O presente estudo demonstrou que entre as temperaturas de 15 °C e 12,5 °C o período de incubação dos ovos aumenta significativamente, pois, enquanto à temperatura de 25 °C esse período foi de 16 horas, nas temperaturas baixas não foi registrado eclosão durante as 32 horas de observação. Bourel e colaboradores (2003), na França, ao submeterem ovos de *Lucilia sericata* (Meigen 1826) a temperaturas próximas de 12 °C, observaram eclosão após 60 horas da postura dos ovos.

Precipitadamente, poderíamos pensar que de 12,5 °C a 15 °C os ovos de *C. megacephala* estariam em diapausa, ou seja, que ao serem submetidos a essas temperaturas o desenvolvimento cessaria, permanecendo este inalterado até os ovos serem novamente expostos à temperatura ambiente (Costa & Ide 2006). No entanto, são necessários períodos mais longos de observação, como demonstrado por Bourel e colaboradores (2003).

Em algumas localidades, sobretudo no hemisfério norte, é recorrente o uso do método de cálculo dos graus-dias acumulados (GDA) para se estimar o IPM (Anderson 2000, Marchenko 2001, Borel *et al.* 2003, Arnott & Turner 2008, Souza & Kirst 2010, Oliveira-Costa 2011). Esse método considera o tempo de duração do desenvolvimento do inseto e a temperatura a que este foi submetido, fornecendo a quantidade de energia ou calor acumulado que é requerido para o inseto completar as fases do seu ciclo de vida (Marchenko 2001, Oliveira-Costa 2011). O cálculo do GDA leva em consideração a temperatura limiar inferior de desenvolvimento, a qual corresponde à temperatura limite suportada pelo inseto (Marchenko 2001). Assim, além de outras dificuldades encontradas para a utilização desse método de estimativa do IPM (Anderson 2000), é necessário conhecer a menor temperatura que possibilita a continuidade do desenvolvimento da espécie de interesse, visto que esse valor limite é específico para cada espécie (Marchenko 2001) e possivelmente para cada população (Ames & Tuner 2003, Bourel *et al.* 2003). Com base no presente estudo, podemos inferir que a temperatura limiar inferior de desenvolvimento para *C. megacephala* em nossa região está entre 12,5 °C e 10 °C, visto que os ovos submetidos a última temperatura não conseguiram dar continuidade ao seu desenvolvimento.

Gabre e colaboradores (2005) afirmam que em função da importância à entomologia forense, bem como da expansão geográfica das populações de *C. megacephala* e de sua relevância médico-veterinária, investimentos em mais estudos a respeito da biologia e ecologia dessa espécie devem ser realizados.

Contudo, o uso de *C. megacephala* na estimativa do IPM deve ser feito com ressalva em situações singulares, pelo fato dos registros de miíases em humanos causados por essa espécie. Como relatado por Ferraz e colaboradores (2010), 114 espécimes de *C. megacephala* foram coletadas de lesões cutâneas presentes em um indigente da cidade do Rio de Janeiro, e por Sukontason e colaboradores (2005), os quais registraram o primeiro caso da Tailândia de miíase causada por essa espécie. Nesse estudo tailandês indivíduos de *C. megacephala* em 3º ínstar foram coletados de um cadáver humano 1 dia após a morte, fato que indica a presença das larvas antes da morte. Os autores ressaltam que caso esses espécimes fossem considerados para a estimativa do IPM, o resultado seria errôneo.

CONCLUSÕES

- ✓ O tempo mínimo de desenvolvimento observado para a espécie *C. megacephala*, à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo e umidade naturais, na região de Florianópolis/SC é de 258 horas (10,75 dias);
- ✓ O tempo de incubação dos ovos registrado foi de 16 horas;
- ✓ O tempo mínimo acumulado se atingir cada uma das fases de imaturos de *C. megacephala* foi de 16 horas para larva 1º ínstar, 36 horas para larva 2º ínstar, 54 horas para larva 3º ínstar, 114 horas para pré-pupa e 126 horas para pupa;
- ✓ Não foi possível estabelecer correlação entre os estágios de vida e os tamanhos dos imaturos de *C. megacephala*;
- ✓ Registrou-se a eclosão de ovos de *C. megacephala* mantidos a temperaturas constantes de 12,5 °C a 15 °C e umidade relativa à natural, por até 32 horas, e em seguida expostos à temperatura de 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de umidade naturais;
- ✓ A temperatura limiar para o desenvolvimento embrionário de *C. megacephala*, na região de Florianópolis, está abaixo de 12,5 °C e acima de 10 °C.

REFERÊNCIAS

Ames, C. & Turner, B. Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 17, p. 178 – 186, 2003.

Anderson, D. L.; Sedgley, M.; Short, J.R.T.; Allwood, A.J. Insect pollination of mango in northern Australia *Mangifera indica*, includes *Apis mellifera*. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 33, n. 3, p. 541 – 548, 1982.

Anderson, G. S. Minimum and maximum development rates of some forensically important Calliphoridae (Diptera). **Journal of Forensic Science**, v. 45, n. 4, p. 824 – 832, 2000.

Arnott, S. & Turner, B. Post-feeding larval behaviour in the blowfly, *Calliphora vicina*: Effects on post-mortem interval estimates. **Forensic Science International**, n. 177, p. 162 – 167, 2008.

Barros-Cordeiro, K. B. & Pujol-Luz, J. R. Morfologia e duração do desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) em condições de laboratório. **Papéis Avulsos de Zoologia: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo**, v. 50, n. 47, p. 709 - 717, 2010.

Barros-Cordeiro, K. B. **Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya albiceps* (Diptera: Calliphoridae) sob condições controladas em laboratório e contribuições para a entomologia forense**. 2011. 27 f. Monografia (Graduação em Biologia) – Consórcio Setentrional de Educação a Distância, Universidade de Brasília/ Universidade Estadual de Goiás, Brasília, 2011.

Bourel, B.; Callet, B.; Hédouin, V.; Gosset, D. Flies eggs: a new method for the estimation of short-term post-mortem interval? **Forensic Science International**, v. 135, n. 1, p. 27 – 34, 2003.

Cabral, M. M. O.; Mendonça, P. M.; Gomes, C. M. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Dias, C. S.; Soares, M. J.; Queiroz, M. M. C.. Biological activity of Yangambin on the postembryonic development of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae). **Journal of Medical Entomology**, v.44, n. 2, p. 249 - 255, 2007.

Carvalho, C. J. B. & Mello-Patiu, C. A. Key to the adults of the most common forensic species of Diptera in South America. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 3, p. 390 - 406, 2008.

Carvalho, L. M.; Thyssen, P. J.; Linhares, A. X.; Palhares, F. A. B. A checklist of arthropods associated with pig carrion and human corpses in Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 1, p. 135 - 138, 2000.

Carvalho, L. M. & Linhares, A. X. Seasonality of insect succession and pig carcass decomposition in a natural forest in Southeastern Brazil. **Journal of Forensic Sciences**, v. 46, p. 604 - 608, 2001.

Catts, E. P. & Goff, M. L. Forensic entomology in criminal investigations. **Annual Review of Entomology**, v. 37, p. 253 - 272, 1992.

Costa, C. & Ide, S. Fases do desenvolvimento. In: Costa, C.; Ide, S.; Simonka, C. E. **Insetos Imaturos: metamorfose e identificação**. Ribeirão Preto: Holos, 2006, p. 19 - 29.

Crystal, M. M. Longevity of screwworm flies, *Cochliomyia hominivorax* (Coquerel) (Diptera: Calliphoridae). Effect of sex and groupin. **Journal of Medical Entomology**, v. 4, n. 4, p. 479 - 482, 1967.

Estrada, D. A.; Grella, M. D.; Thyssen, P. J. & Linhares, A. X. Taxa de desenvolvimento de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (Diptera: Calliphoridae) em dieta artificial acrescida de tecido animal para uso forense. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 2, p. 203 - 207, 2009.

Ferraz, A. C. P.; Proença, B.; Gadelha, B. Q.; Faria, L. M.; Barbalho, M. G. M.; Aguiar-Coelho, V. M.; Lessa, C. S. S. First record of human myiasis caused by association of the species *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae), *Sarcophaga* (Liopygia) *ruficornis* (Diptera: Sarcophagidae), and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n.3, p. 487 - 490, 2010.

Ferreira, M. J. M. Sinantropia de dípteros muscoideos de Curitiba, Paraná. I. Calliphoridae. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38, n. 2, p. 445 - 454, 1978.

Gabre, R. M.; Adham, F. K.; Chi, H. Life table of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). **Acta Oecologica**, v. 27, p. 179 - 183, 2005.

Greenberg, B. Flies as forensic indicators. **Journal of Medical Entomology**, v. 28, p. 565 - 577, 1991.

Guimarães, J. H.; Prado, A. P.; Linhares, A. X. Three newly introduced blowfly species in southern Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, n. 22, n. 1, p. 53 - 60, 1978.

Guimarães, J. H.; Prado, A. P.; Buralli, G. M. Dispersal and distribution of three newly introduced species of *Chrysomya* Robineau-Desvoidy in Brazil (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, n. 23, n. 4, p. 245 - 255, 1979.

Herzog, J. D. A.; Milward-de-Azevedo, E. M. V.; Ferreira, Y. L. Observações preliminares sobre o ritmo horário de oviposição de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae). **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, 21 (1): 101-106, 1992.

Juk, L. B. **Levantamento da fauna de artrópodes em carcaça de suíno em ambiente silvestre com vegetação de restinga na Ilha de Santa Catarina como subsídio para as ciências forenses**. 2013. 79 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

Kamal, A. S. Comparative study of thirteen species of sarcosaprophagous Calliphoridae and Sarcophagidae (Diptera) I. Bionomics. **Annals Entomological Society of America**, v. 51, p. 261 - 270, 1958.

Kosmann, C.; Macedo, M. P.; Barbosa, T. A. F.; Pujol-Luz, J. R. *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) and *Hemilucilia segmentaria* (Fabricius) (Diptera, Calliphoridae) used to estimate the postmortem interval in a forensic case in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 4, p. 621 - 623, 2011.

Kosmann, C. **Calliphoridae (Diptera): identificação, sinantropia e análise microbiológica**. 2013. 234 f. Tese (Doutorado em Biologia Animal) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

Laurence, B. R. Old world blowflies in the New World. **Parasitology Today**, v. 2, n. 3, p. 77 – 79, 1986.

Leal, T. T. S.; Prado, A. P. P.; Antunes, A. J. Rearing the larvae of the blowfly *Chrysomya chloropyga* (Wedemann) (Diptera, Calliphoridae) on oligidic diets. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 1, p. 41 – 44, 1982.

Linhares, A. X. & Thyssen, P. J. Entomologia forense, míases e terapia larval. In: Rafael, J. A.; Melo, G. A. R.; Carvalho, C. J. B.; Casari, S. A.; Constantino, R. (Org.). **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, 2012, p. 152 - 163.

Lord, W. D. & Stevenson, J. R. **Directory of forensic entomologists**. 2 ed. Misc. Publ. Armed Forces Pest Mgt. Board, Washington, D.C, 42 p, 1986.

Marchenko, M. I. Medicolegal relevance of cadáver entomofauna for the determination of the time of death. **Forensic Science International**, v. 120, p. 89 - 109, 2001.

Marques, M. D. Anatomia interna e fisiologia. In: Rafael, J. A.; Melo, G. A. R.; Carvalho, C. J. B.; Casari, S. A.; Constantino, R. (Org.). **Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia**. Ribeirão Preto: Holos, p. 34 – 80, 2012.

Mello, R. P. Chave para a identificação das formas adultas das espécies da família Calliphoridae (Diptera, Brachycera, Cyclorrhapha) encontradas no Brasil. **Entomologia y Vectores**, v. 10, n. 2, p. 255 - 268, 2003.

Mello-Patiu, C. A. & Silva, K. P. Noções de dipterologia. In: Oliveira-Costa, J. **Entomologia Forense: quando os insetos são vestígios**. 3. ed. Campinas: Millennium, p. 73 – 86, 2011.

Mendonça, P. M. & D’Almeida, J. M. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1794) (Diptera: Calliphoridae) em dietas artificiais à base de leite. **Entomologia y Vectores**, v. 11, n. 1, p. 59 – 67, 2004.

Milward-de-Azevedo, E. M. V.; Carraro, M. V.; Martins, C.; Moreira, O. I.; Cruz, M.; Serafin, I. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) em diferentes temperaturas, sob condições experimentais. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 4, p. 793 - 798, 1996.

Olea, M. S.; Juri, M. J. D.; Centeno, N. First report of *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) in northwestern Argentina. **Florida Entomological Society**, v. 94, n. 2, p. 345 - 346, 2011.

Oliveira, V. C.; D'Almeida, J. M.; Abalem de Sá, I. V.; Mandarino, J. R.; Solari, C. A. Enterobactérias associadas a adultos de *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) e *Chrysomya megacephala* (Fabricius, 1754) (Diptera: Calliphoridae) no Jardim Zoológico, Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 4, p. 556 - 561, 2006.

Oliveira-Costa, J. **Entomologia Forense**: quando os insetos são vestígios. 3. ed. Campinas: Millennium, 2011.

Picard, C. J. First record of *Chrysomya megacephala* Fabricius. (Diptera: Calliphoridae) in Indiana, U.S.A. **Proceedings of the Entomological Society of Washington**, v. 115, n. 3, p. 265 - 267, 2013.

Pinheiro, D. S.; Reis, A. A. S.; Jesuino, R. S. A.; Silva, H. M. V. Variáveis na estimativa do intervalo pós-morte por métodos de entomologia forense. **Enciclopédia Biosfera**: centro científico conhecer. Goiânia, v. 8, n. 14, p. 1442 - 1458, 2012.

Pires, S. M.; Cárcamo, M. C.; Zimmer, C. R.; Ribeiro, P. B. Influência da dieta no desenvolvimento e investimento reprodutivo de *Chrysomya megacephala* (Fabricius: 1794) (Diptera: Calliphoridae). **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, v. 76, n. 1, p. 41 - 47, 2009.

Prado, A. P.; Guimarães, J. H. Estado atual de dispersão e distribuição do gênero *Chrysomya* Robineau-Desvoidy na região neotropical (Diptera, Calliphoridae). **Revista Brasileira de Entomologia**, n. 26, n. 3/4, p. 225 - 231, 1982.

Prins, A. J. Morphological and biological notes on six South African blow-flies (Diptera, Calliphoridae) and their immature stages. **Annals of the South African Museum**, v. 90, n. 4, p. 201 – 217, 1982.

Pujol-Luz, J. R.; Arantes, L. C.; Constantino, R. Cem anos da Entomologia Forense no Brasil (1908-2008). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 52, n. 4, p. 485 - 492, 2008.

Queiroz, M. M. de C. & Milward-de-Azevedo, E. M. V. Técnicas de criação e alguns aspectos da biologia de *Chrysomya albiceps* (Wiedemann) (diptera, Calliphoridae), em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 8, p. 75 - 84, 1991.

Richards, C. S. & Villet, M. H. Factors affecting accuracy and precision of thermal summation models of insect development used to estimate post-mortem intervals. **International Journal of Legal Medicine**, n. 122, p. 401 – 408, 2008.

Ruiz, R. A. **Aspectos da biologia larval de *Chrysomya megacephala* (F.) (Diptera: Calliphoridae): curva de crescimento e período de mais rápido desenvolvimento larval.** 2007. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

Santos, M. B.; Martins, C.; Milward-de-Azevedo, E. M. V. Desenvolvimento pós-embrionário de *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) criada em dietas a base de sardinha previamente exposta, por diferentes períodos, a condições controladas. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 4, p. 799 - 805, 1996.

Souza, A. S. B. & Kirst, F. D. Aspectos da bionomia e metodologia de criação de dípteros de interesse forense. In: Gomes, L (Org.). **Entomologia Forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais.** 1. ed. Rio de Janeiro: Technical Books, p. 169 - 182, 2010.

Souza, C. M.; Thyssen, P. J.; Linhares, A. X. Effect of nandrolone decanoate on the development of three species of *Chrysomya* (Diptera: Calliphoridae), flies of forensic importance in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 1, p. 111 - 117, 2011.

Sukontason, K. L.; Narongchai, P.; Sripakdee, D.; Boonchu, N.; Chaiwong, T.; Ngern-Klun, R.; Piangjai, S.; Sukontason, K. First report of human myiasis caused by *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* (Diptera: Calliphoridae) in Thailand, and its implication in Forensic Entomology. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 4, p. 702 - 704, 2005.

Sukontason, K.; Piangjai, S.; Siri wattanarungsee, S.; Sukontason, K. L. Morphology and developmental rate of blowflies *Chrysomya megacephala* and *Chrysomya rufifacies* in Thailand: application in forensic entomology. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1207 – 1216, 2008.

Sulaiman, S.; Sohadi, A.R.; Yunus, H.; Iberahim, R. The role of some cyclorrhaphan flies as carriers of human helminths in Malaysia. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 2, n. 1, p. 1 – 6, 1988.

Sulaiman, S.; Sohadi, A.R.; Jeffery, J. Human helminth parasite burdens on cyclorrhaphan flies (Diptera) trapped at an aboriginal settlement in Malaysia. **Bulletin of Entomological Research**, v. 79, n. 4, p. 625 – 629, 1989.

Thevan, K.; Ahmad, A. H.; Rawi, C. S. M.; Singh, B. Growth of *Chrysomya megacephala* (Fabricius) Maggots in a Morgue Cooler. **Journal of Forensic Sciences**, v. 55, n. 6, p. 1656 - 1658, 2010.

Turchetto, M. & Vanin, S. Forensic entomology and climatic change. **Forensic Science International**, v. 146, p. 207 - 209, 2004.

Vélez, M. & Wolff, M. Rearing five species of Diptera (Calliphoridae) of forensic importance in Colombia in semicontrolled field conditions. **Papéis Avulsos de Zoologia**: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, v. 48, n.6, p. 41 - 47, 2008.

Von Zuben, C. J. Competição larval em *Chrysomya megacephala* (Diptera, Calliphoridae): Estimativa de perdas em biomassa e na fecundidade e cálculo de conversão de alimento em biomassa. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 37, n. 4, p. 793 – 802, 1993.

Von Zuben, C. J. Comportamento de oviposturas individuais, percentagem de eclosão e peso larval mínimo para pupação em populações

de *Chrysomya megacephala* (F.). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 27, n. 4, p. 525 – 533, 1998.

Voss, S. C.; Cook, D. F.; Dadour, I, R. Decomposition and insect succession of clothed and unclothed carcasses in Western Australia. **Forensic Science International**, v. 211, p. 67 – 75, 2011.

Wells, J. D. & Kurahashi, H. *Chrysomya megacephala* (Fabricius) (Diptera: Calliphoridae) development: rate, variation, and the implications for forensic entomology. **Japanese Journal of Sanitary Zoology**, v. 45, n. 4, p. 303 - 309, 1994.

Yang, S. T. & Shiao, S. F. Oviposition preferences of two forensically important blow fly species, *Chrysomya megacephala* and *C. rufifacies* (Diptera: Calliphoridae), and implications for postmortem interval estimation. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 2, p. 424 - 435, 2012.